

計畫編號：DOH93-DC-1005

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

黃病毒單株抗體製備之研究

研究報告

執行機構：財團法人佛教慈濟綜合醫院

計畫主持人：陳立光

研究人員：楊惠華

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

目次	頁數
摘要	(3)
(一) 前言	(7)
(二) 材料與方法	(9)
(三) 結果	(12)
(四) 結論與建議	(14)
(五) 參考文獻	(16)
(六) 圖表	(18)

中文摘要

黃病毒家族有七十三個病毒，其中三十四個經由蚊子傳染、十七個由壁蝨傳染，另外造成人畜共通之二十二個黃病毒的媒介則是未知的。可造成人類疾病的有四十個黃病毒，當然包括了已知最重要的三個人類病媒傳染病：黃熱病、登革熱及日本腦炎。在最新公佈的傳染病防治法中，我國衛生署也將這三種病例為第一級及第三級的法定傳染病。本計畫之目的在研究如何製備單株抗體可以辨認造成上述三種疾病之黃病毒，以及近來正快速新興的另一個黃病毒--西尼羅病毒，供行政院衛生署疾病管制局應用於對黃病毒的流行病學研究及疾病之控制與預防。

本計畫在過去三年中將以上四種黃病毒或其抗原分別免疫小鼠後，取其脾臟細胞製成融合瘤細胞，經篩選出可以生產辨認黃病毒抗體之單株細胞株，大量繁殖產製純化之單株抗體之後，更進一步對小鼠單株抗體的種類及辨認之抗原定性，最後再測定這些單株抗體對其他種黃病毒之交叉反應性。有實用價值的抗黃病毒單株抗體將進行高純度的量產，提供疾病管制局使用於黃病毒感染症的研究及管制。

本計畫在前兩年已完成日本腦炎、登革及黃熱病毒之單株抗體研發及製備，現在第三年的目標為西尼羅病毒，在此年中，本實驗室也順利地得到生產抗西尼羅病毒單株抗體融合瘤 37 株，經單株抗體之抗原性研究結果顯示：5 株為泛黃質病毒均可辨認，其他大部份均辨認西尼羅及其他黃質病毒之亞型(KUN 最多)，僅有一株為真正西尼羅特異性，經西方墨點試驗證明其抗

原決定位為西尼羅病毒 E 蛋白上之立體決定位。37 株單株抗體中只有三株辨認直線決定位,兩株位於E蛋白上,一株在NS-1 蛋白上,但三株直線抗原決定位均與 KUN 病毒產生交叉反應。

本實驗室為了追上第一年延後的進度也順利得到 12 株可作用於登革第四型病毒 NS-1 蛋白之單株抗體,其中一株辨認所有其他黃質病毒,另外兩株辨認所有四型登革病毒,其他 9 株只辨認登革第四型病毒。因本年度成果豐碩,不但完成本年工作,且使三年計畫均可達成預訂目標。

中文關鍵詞(至少三個)：黃病毒、單株抗體、流行病學、疾病控制

Abstract

The genus *Flavivirus* is composed of about 73 viruses. Of these viruses, 34 are mosquito borne, 17 are tick borne, and 22 are zoonotic agents transmitted with now known vector. Forty species of the flavivirus family have been associated with human disease. Yellow Fever, Dengue Fever, and Japanese Encephalitis, are the most important arboviral infectious diseases across every continent and have been legitimized into Class I and Class III transmissible disease, must be reported, in current issue of Regulation of Prevention and Control for Transmission Disease at Taiwan. The specific aim in this proposal is generation of monoclonal antibodies (MoAb)s against four flaviviruses, including the emerging West Nile in addition to the three viruses mentioned above for CDC at Taipei.

In the third year of three-year proposal, BALB/c mice will be immunized by these 4 different flaviviruses and hybrids will be generated by fusion of myeloma cells and immunized splenocytes. After selection the virus-specific antibody-producing hybridoma in HAT culture medium, cloning will be done with limiting dilution method. The virus-specific (MoAb)s will be purified from ascites of NOD/*scid* mice injected intraperitoneally with hybridoma cells. The antigenic specificity and typing of immunoglobulin subclass of (MoAb)s will be characterized and optimal sandwich ELISA pairing between MoAbs will be crossmatched.

In the third year, 37 (MoAb)s were successfully generated against West Nile virus. However, five of these 37 (MoAb)s cross-react to all flaviviruses tested, and most of other mAbs not only recognize WNV but also cross-react to KUN virus. Only one is qualified as WNV-specific (MoAb)s, do not react any other flavivirus except E protein of WNV. Furthermore, western blot results showed that conformational epitopes are

recognized by most (MoAb)s, linear epitopes only be recognized by 3 (MoAb)s, one linear epitope on NS-1 protein and other 2 on E protein. Nevertheless, the linear epitopes are also found cross-react to KUN virus.

In the third year, we also completed the work, characterization of 12 (MoAb)s against type 4 dengue (Den 4) virus, left from the 2nd. year. All of them react to NS-1 protein of Den 4 virus but one of the twelve recognized a linear epitope on NS-1 of all flaviviruses be tested. Conformational epitopes on NS-1 of Den 4 were recognized by other 11(MoAb)s, Two of the eleven (MoAb)s showed cross-react to all 4 types of dengue viruses and the other 9 are Den 4-specific.

Keyword: Flavivirus, Monoclonal Antibody, Epidemiology, Disease Control

前言

政策或法令依據

根據民國八十八年六月四日在立法院三讀通過之中華民國行政院衛生署傳染病防治法⁽¹⁾，第三條中將黃病毒引起的黃熱病毒列為第一類傳染病，登革熱及日本腦炎列為第三類傳染病。第二十九條中明定疑似這三種傳染病必須通報的時限。而感染黃熱病的患者第三十五條中更被規定必需接受強制隔離治療。當然檢驗黃熱病的任務也在第三十六條中確定為中央主管機關之職責。若違反以上等規定，則在第四十條至第四十四條定有嚴重的罰則。由以上法令規定可見我政府對黃病毒引起之上述三大傳染病之重視。本計畫之提出是反應行政院衛生署疾病管制局於九十年九月二十八日在網站 <http://www.cdc.gov.tw> 上公開徵求「九十年度科技發展研究計劃」而提出。

問題狀況

黃病毒家族有六十九個病毒，其中六十七個均經由病媒傳染。可造成人類疾病的有三十八個黃病毒，當然包括了已知最重要的三個人類病媒傳染病：黃熱病、登革熱及日本腦炎⁽²⁾。至目前為止，對黃病毒引起的疾病並沒有治療的特效藥，在傳染的控制方面，有些黃病毒如黃熱病毒、日本腦炎病毒有疫苗可以施打；但其他黃病毒引起的流行病如登革熱就只有靠早期準確的診斷後，儘速撲殺病媒蟲來中止流行的傳染。在診斷時要測定標本中是否有病毒抗原或要測定病人血清中是否有抗病毒的抗體存在，都要先有可辨認病毒抗原所必須的試劑——病毒抗原特異性抗體。而要減少錯誤診斷，就必須使用背景值極低的病毒抗原特異性純化單株抗體。可惜這類產品在市面上並無成品發售，少數可由 ATCC 取得之單株抗體，因結合力差而診斷效果不佳，國際雜誌上有些外國實驗室雖報導有可用之單株抗體⁽³⁾，但大都吝於贈予。因此對想要診斷用黃病毒特異性單株抗體有取得困難之問題。

發展需求

黃熱病毒近年來流行的區域是南美洲及非洲^(2,4)，為何同樣緯度的亞洲卻未見感染報告？一直是個有趣的問題，但在交通如此快捷方便的今天，世界已相對地縮小了，黃熱病毒在東南亞是被低估的結果或是真的不存在，已經不重要了。反而是黃熱病在傳染病防治法中被列為第一類（最可怕的）法定傳染病卻是即定政策。所以發展黃熱病的診斷及控制方法是不可推卸的責任。台灣地處日本腦炎及登革熱的流行地區，日本腦炎雖有疫苗的施打多年，但每年仍有數十個確定病例，而且年齡層有增高的趨勢⁽⁵⁾。登革熱並不是年年大流行，但流行之頻率有逐年增加的趨勢。尤其是今年高雄縣市流行的登革熱疫情，依據衛生署疾病管制局截至 91 年 10 月 29 日為止⁽⁶⁾，已共計超過 4000 個登革熱確定病例數了，因此流行的病毒也由以前的境外移入漸漸變為在此生根的本土型登革熱病毒。加上日本腦炎及登革熱均被傳染病列為第三類法定傳染病⁽¹⁾，既然自國外取得辨識黃病毒之單株抗體困難，自己產製就是當務之急。因此六年前在本計畫主持人的實驗室就開始產製抗日本腦炎及登革熱病毒之單株抗體，並慷慨的贈與國內外各黃病毒研究單位共享，因使用本實驗室提供的單株抗體得到結果而寫成文章也已陸續刊出。

西尼羅病毒是近來再新興的一個黃病毒⁽⁷⁾，中東是最早流行的地區，但近十年來迅速的向北擴展至東歐、俄國，向南擴展至幾乎整個非洲，向西延伸至中歐、西歐，甚至渡過大西洋，在 1999 年於美國紐約州造成腦炎的大流行^(8,9)，截止至 2001 年 7 月的最新資料顯示最少感染了十四個州的鳥類⁽¹⁰⁾。從美國 CDC 網站上公佈的西尼羅病毒 2000 年及最近 2002 年之地理分佈（圖一）⁽¹¹⁾，可看出此病毒正以極快的速度從東西兩方面向我國夾殺而來。所以為了不久的未來，可能將面臨要控制西尼羅病毒的感染，在此計畫中特別將之納入要生產單株抗體辨認之黃病毒之一。

材料與方法

1.方法：

單株抗體之製備：

六至八週齡之 BALB/cJ 雌性小鼠經由腹腔內免疫注射 3×10^6 pfu 的黃病毒，加等體積之 Freund's 完全佐劑。追加免疫注射三次，分別間隔兩週，但改加不完全佐劑。免疫四次後隻小鼠抽取眼窩血，以免疫酵素法 (ELISA) 測定血清中抗黃病毒抗體之效價⁽¹⁸⁾。高效價小鼠之脾臟細胞以無菌技術取出後和 NS-1 骨髓瘤細胞在含有 PEG 之溶液中融合，在經含有 HAT 之培養液篩選⁽¹⁷⁾，會分泌抗黃病毒抗體之融合瘤細胞用免疫酵素法⁽¹⁸⁾挑選出來，以限制稀釋法進行單一細胞培養成單細胞株，再一次使用免疫酵素法⁽¹⁸⁾找出能分泌辨識黃病毒單株抗體的融合瘤細胞株。

能生產單株抗體的融合瘤細胞株冷凍保存在液態氮中，當要生產時取出解凍培養至足夠的數目後， 1×10^7 個細胞注射入經 Freund's 不完全佐劑刺激過的多產 NOD/scid 母鼠腹腔中，等待腹腔漲大時，定時抽取腹水。收集起來的含單株抗體腹水將經含 Protein A 或 Protein G 之親和性層析管柱吸附後沖下，純化之單株抗體以抗體純化液相層析系統 (AKTA Prime System) 收集後，再以光譜儀及蛋白質分析法定量保存於-80 凍箱中。

單株抗體種類之定性：

經黃病毒免疫小鼠脾臟細胞融合瘤產生之單株抗體之種類或亞種，將用小鼠融合瘤亞種分型組件 (Borehringer Mannheim 公司) 來測定⁽¹⁹⁾。這是實驗室採用免疫酵素法來區別單株抗體是小鼠抗體種類中的 IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 或 IgM，其詳細步驟將依據廠商隨附之使用方法手冊。單株抗體為何種類決定其吸附實驗時使用 Protein A 或 Protein G。

單株抗體結合黃病毒抗原之定性：

對黃病毒抗原呈免疫酵素反應陽性的單株抗體將進一步進行所結識黃病毒抗原之定性。本計畫將採用輻射免疫沉澱法⁽²⁰⁾測定病毒抗原之分子量大小，推算出是黃病毒抗原中的那一個。黃病毒感染細胞在無 Methionine 及 Cysteine 的 RPMI-1640 中培養一小時後，加入 50 μ Ci 的 ³⁵S Pro-Mix (Amersham) 再培養四小時。細胞經 PBS 經 PBS 洗淨後溶解在含有蛋白酵素抑制劑的細胞溶解緩衝液中。細胞溶液中加入待測單株抗體及 Protein A (或 Protein G) 包裹之 Sepharose (Pharmacia 公司) 後在室溫中作用一小時。免疫複合物吸附之 Sepharose 以 RIPA 緩衝液沖洗後煮沸，釋出之抗原分子再經 10% SDS-PAGE 後，自我輻射顯影找出抗原分子量之大小。

單株抗體對不同黃病毒抗原之交叉反應定性：

已經測知抗原性的黃病毒單株抗體經量產純化後，將進一步以免疫墨漬法 (Immunoblot) 測定是否會交叉反應其他黃病毒抗原⁽²⁰⁾。要點如下：不同黃病毒感染之細胞以溶解緩衝液溶解，其蛋白質經 SDS-PAGE 分開後轉漬至 Nitrocellulose 膜 (Hybond-C Super; Amersham 公司) 上，經含 5% 脫脂奶粉之 PBS 阻斷非特異結合後，加入待測單株抗體及 HP 酵素結合之山羊抗小鼠免疫球蛋白反應後，轉變受質 4-chloro-1-naphthol 呈色。

2.材料：

病毒及培養細胞：

本計劃中所將使用的黃病毒說明劍下表：

病毒	株名	來源	參考資料
日本腦炎病毒	NT109	自有	12, 13
登革病毒第一型	HAWAIIAN	自有	ATCC
登革病毒第二型	PL046	自有	14
登革病毒第三型	H-87	自有	ATCC
登革病毒第四型	H-241	自有	ATCC
黃熱病毒	17D	衛生署疾病管制局	15, 16
西尼羅河病毒	VR-1510	衛生署疾病管制局	ATCC

以上黃病毒的增殖將以昆蟲細胞株 C6/36 或哺乳類動物細胞株 BHK-21 在添加胎牛血清及 L-Glutamine 的 RPMI-1640 培養液中進行。

結果

一、西尼羅病毒的製備：

西尼羅病毒株 VR-1510 由衛生署疾病管制局提供，在本實驗室中以 BHK-21 細胞大量增殖後，低溫保存於-80 冰箱中，被感染 30 小時的 BHK-21 細胞，用黃質病毒特異性的單株抗體 YF081 進行免疫螢光染色，結果顯示於圖二。

二、抗西尼羅病毒單株抗體的產生：

四週齡的 BALB/cJ 母鼠經西尼羅病毒與佐劑混合液以腹腔內注射免疫四次後，血清中抗西尼羅病毒的抗體效價高達 1：4000 後，予以犧牲並取其脾臟細胞與骨髓瘤細胞 NS1 進行融合，融合後以 HAT 培養液篩選融合瘤細胞，會產生對抗西尼羅病毒抗原的融合瘤以倍數稀釋法進行單株培養。結果共有 92 株融合瘤可產生抗體，以免疫螢光染色法偵測出有 41 株融合瘤可與西尼羅病毒抗原結合，結果顯示於圖三，此 41 株融合瘤再以 ELISA 方式偵測出有 41 株融合瘤可與西尼羅病毒抗原結合，此 41 株融合瘤中有 4 株因也會與 Mock 細胞結合，因此得到了 37 株抗西尼羅病毒的單株抗體。

三、抗西尼羅病毒單株抗體之抗原特異性研究：

表一為以免疫螢光測定法檢測上述 37 株抗西尼羅病毒單株抗體與黃病毒家族中其他成員交叉反應之結果。由此結果顯示此 37 株單株抗體對其他黃病毒家族成員之交叉反應程度不盡相同。其中 34-6H，59-4A，73-2B，89-8F 及 92-6H 五株單株抗體可認所有測試之黃質病毒，剩下 32 株中 31 株除了西尼羅病毒外均與一種以上之黃質病毒起交叉反應，其中以 KUN 病毒最嚴重。只有一株 47-5F 不和其他黃質病毒作用，卻和西尼羅病毒有十分明顯反應，可說是西尼羅特異性單株抗體。

四、抗西尼羅病毒單株抗體之抗原蛋白以西方墨點檢測結果(圖四)：

37 株單株抗體中 26 株可生產足夠之小鼠腹水完成西方墨點試驗，結果(表一)顯示 7 株單株抗體之抗原蛋白為 NS-1 蛋白，其中 6 株之抗原決定位為立體的，只有一株辨認直線抗原決定位。而其他 19 株單株抗體之抗原均為 E 蛋白，其中也有兩株辨認直線抗原決定位，剩下 17 株均辨認 NS-1 上的立體決定位。有趣的結果是泛黃質病毒均認的單株抗體其抗原決定位均位於黃質病毒之 E 蛋白上。

五、抗第四型登革病毒單株抗體之抗原特異性結果：

因計畫執行第一年遇到國家動物中心供應小鼠不足，部份工作及結果延至第三年完成，抗第四型登革病毒之單株抗體順利產生 12 株，其交叉反應結果請見表二，其中 16-6D 辨認所有測試之黃質病毒，而 2-3E 及 3-5C 兩株只辨認所有 4 型登革病毒，可稱之為登革病毒特異抗體。其他 9 株卻只認登革第四型病毒，當然就是登革第四型病毒之特異性單株抗體。

六、抗第四型登革病毒單株抗體之抗原蛋白及決定位研究結果：

以西方墨點試驗測試抗第四型登革病毒 12 株單株抗體之抗原蛋白結果(表二)顯示所有 12 株單株抗體之抗原均為第四型登革病毒之 NS-1 蛋白。只有 16-6D 在病毒抗原 Denature 後仍能辨認，可見是認直線抗原決定位，其他 11 株抗體都辨認 NS-1 蛋白上的立體抗原決定位。

七、三年抗黃質病毒單株抗體製備之總結果：

針對台灣地區特有之黃病毒 JEV，DENV(I-)，法定傳染病 YFV 以及正在美國流行之 WNV，本計畫進行了三年單株抗體之製備，根據其抗原特異性整理成表三，共計 26 大類，目前均已對其特性定性完畢，大部份也完成小鼠腹水之生產，隨時可供 CDC 使用。

結論與建議

結論

- A. 已完成日本腦炎病毒之特異性單株抗體之製備及生產
- B. 已完成登革病毒第一型之特異性單株抗體之製備及生產
- C. 已完成登革病毒第二型之特異性單株抗體之製備及生產
- D. 已完成登革病毒第三型之特異性單株抗體之製備及生產
- E. 已完成登革病毒第四型之特異性單株抗體之製備及生產
- F. 已完成黃熱病毒之特異性單株抗體之製備及生產
- G. 已完成西尼羅病毒之特異性單株抗體之製備及生產(可能為世界唯一)
- H. 已完成抗泛黃病毒之單株抗體之製備及生產
- I. 三年內完成之 26 大類抗黃質病毒單株抗體腹水樣品已繳 CDC 測試評估

建議

- A. 疾管局委託本實驗室生產之黃病毒單株抗體已順利完成，本實驗室生產之各型黃病毒單株抗體具一般提供抗原向廠商訂製(Customerization)之單株抗體達不到的優點，陳述如下：
 - 1. 不需提供純化之抗原。
 - 2. 能得到單株抗體辨認抗原之交叉反應結果。
 - 3. 能篩選某種特定病毒專一性之單株抗體。

4. 能對單株抗體辨認抗原決定性。
5. 能同時得到作用於不同病毒抗原之各種單株抗體。
6. 可提供對病毒中和能力的測試結果。
7. 對生物危險三級(BRG-3)之微生物，也有能力生產單株抗體。

B. 透過主管機關認證 B S L - 3 實驗室，向國外研究單位要求轉移國內沒有之黃質病毒。如 Murray Valley， St. Louis 及 Tick-born 腦炎病毒，可進一步測定本計畫中生產之單株抗體在完整的黃質病毒家族中之專一性。

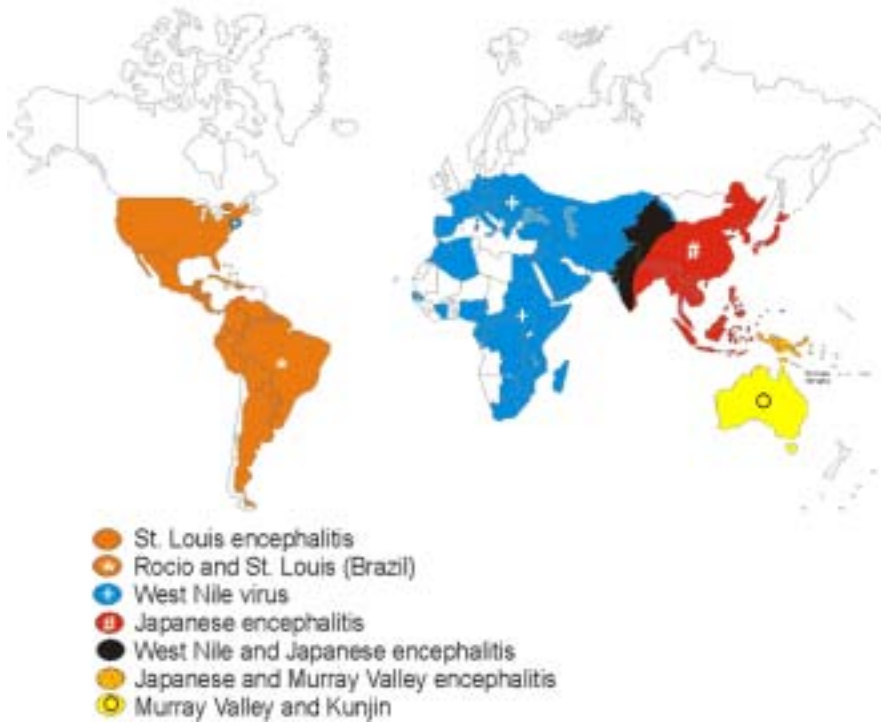
參考文獻

1. 中華民國行政院衛生署傳染病防治法。一九九九年六月四日立法三讀通過。
2. Monath, T.P. and F. X. Heinz. Flaviviruses. Chapter 31, In: Field Virology 3rd ed., 1996; 961-1034.
3. Berret ADT, Mathews JH, Miller BR et al. Identification of Monoclonal antibodies that distinguish between 17D-204 and other strains of yellow fever virus. *J.Gen. Virol* 1990; 71: 13-8.
4. Monath, TP. Yellow fever and dengue—the interaction of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. *Seminars Virol* 1994; 5: 206.1-206.13.
5. 台灣地區傳染病統計暨監視年報 中華民國八十八年，行政院衛生署疾病管制局，中華民國九十年三月，75 頁。
6. 行政院衛生署疾病管制局網站<http://www.cdc.gov.tw/> 91 年 10 月 29 日發佈之新聞稿。
7. Special West Nile Virus. Edition of Emerging Infectious Disease Journal 2001; 7(4): 1-161.
8. Mostashari F, Bunning ML, Kitsutami PT, et al. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lacent* 2001; 358: 261-4.
9. Nash D, Mostashari F, Fina A, et al. The outbreak of West Nile virus infection in New York City area in 1999. *New England Journal of Medicine* 2001; 344: 807-14.
10. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) 2001; 50 (29) : 617-9.
11. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvdid/westnile> Last reviewed Dec.11, 2002.

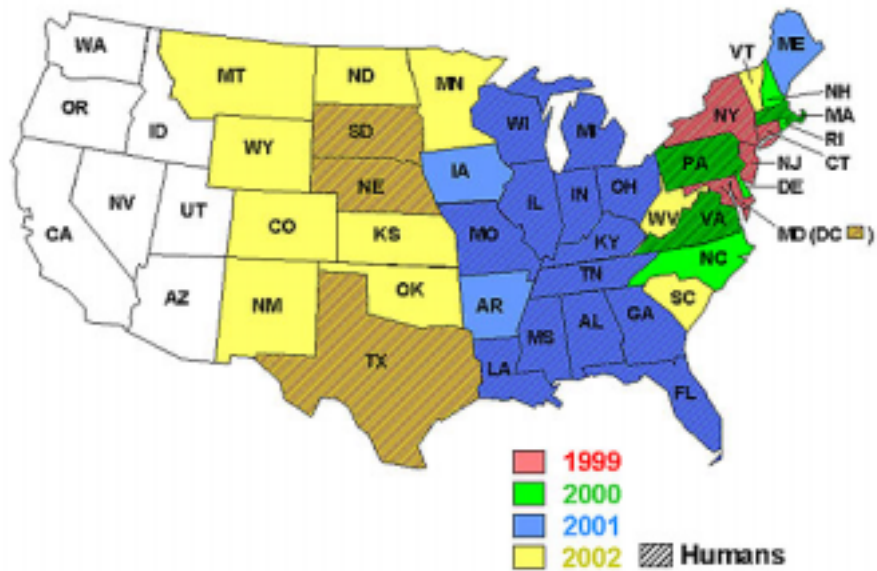
12. Lin, Y.-L., C.-L. Liao, C.-T. Yeh, C.-H. Chang, Y.-L. Huang, Y.-Y. Huang, J.-T. Jan, C. Chin, and L.-K. Chen. 1996. A Highly Attenuated Strain of Japanese Encephalitis Virus Induces the Protective Humoral and Cellular Immunities in Mice. *Virus Research* 44:45-56.
13. Chen. L.-K., Y.-L. Lin, C.-L. Liao, C.-G. Lin, Y.-L. Huang, C.-T. Yeh, S.-C. Lai, J.-T. Jan, and C. Chin. 1996. Generation and Characterization of Organ-tropism Mutants of Japanese Encephalitis Virus in vivo and in vitro. *Virology* 223:79-88.
14. Lin, Y.-L. C.-L. Liao, L.-K. Chen, C.-T. Yeh, C.-I. Liu, S.-H. Ma, Y.-Y. Huang, C.-L. Kao, and C.-C. King. 1998. Study of Dengue Virus Infection in SCID Mice Engrafted with Human K562 Cells. *J. of Virology* 72(12):9729-9737.
15. Stokes A, Bauer JH, Hudson JH. Transmission of yellow fever to Macacus rhesus, preliminary note. *JAMA* 1928; 90: 253-4.
16. Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization. *J. Exp. Med.* 1937; 65: 787-800.
17. Kohler G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature (London)* 1975; 256:495-7.
18. Heinz FX, Berger R, Tuma W, Kunz C. A topological and functional model of epitopes of the structural glycoprotein of tick-borne encephalitis virus defined by monoclonal antibodies. *Virology* 1983; 126:525-37.
19. Manufacture Instruction for Mouse-IgG ELISA (Catt. No. 1 333 151), Roche (Germany) Version 3, July 1999.
20. Huang, J.-H., J.-J. Wey, H.-F. Lee, T.-L. Tsou, C.-S. Wu, J.-R. Wu, H.-M. Chen, C. Chin, L.-K. Chen, M.-J. Pan, and T.-M. Wang. 1996. Identification of Immunodominant, Group-specific and Subcomplex-specific Continuous Epitopes in the Core Regions of Japanese Encephalitis Virus Using Synthetic Peptides. *Virus Research* 41:43-53.



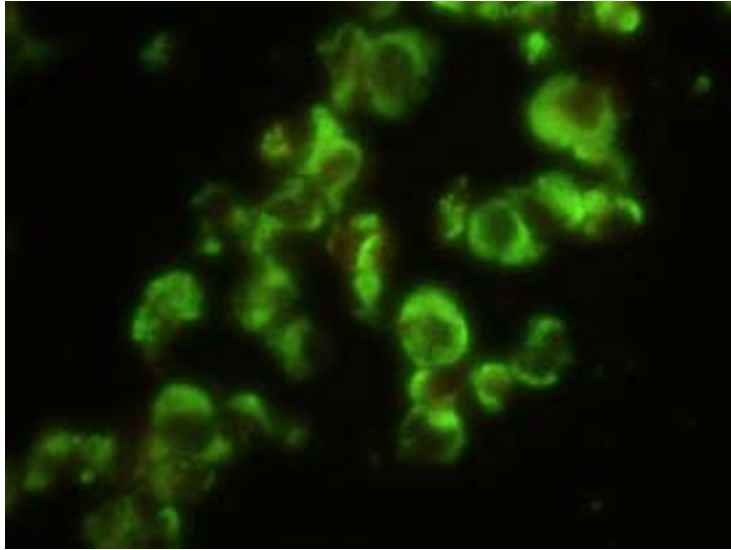
The Geographic Distribution of the Japanese Encephalitis Serocomplex of the Family Flaviridae, 2000.



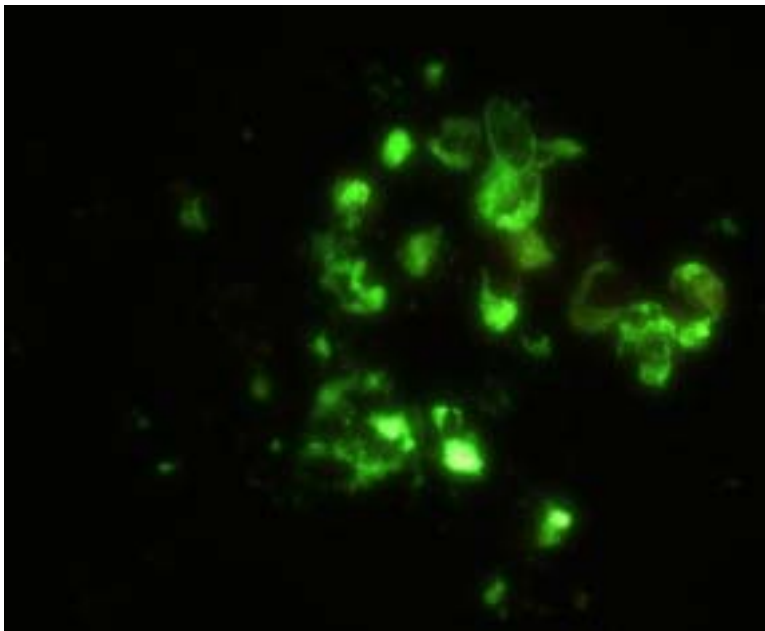
West Nile Virus in the United States, 1999 - 2002



圖二：被西尼羅病毒感染之 BHK-21 細胞與黃質病
毒特異性單株抗體 (YF018) 之免疫螢光反應

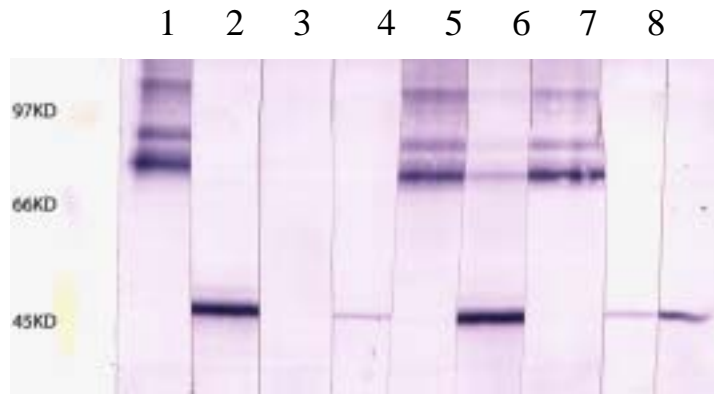


圖三：被西尼羅病毒感染之 BHK-21 細胞與抗西尼
羅病毒單株抗體之免疫螢光反應

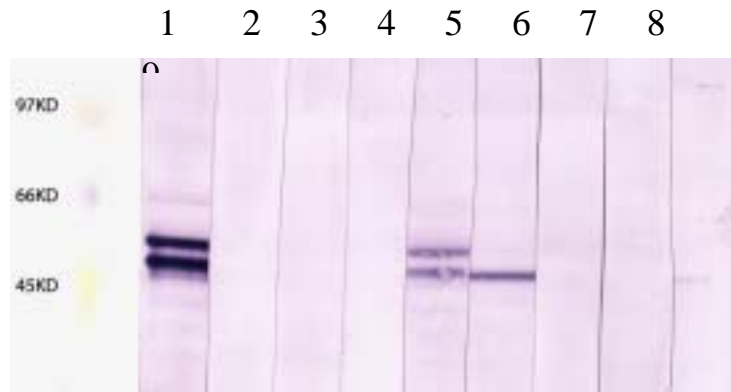


圖四 以西方墨點法檢測抗西尼羅病毒單株抗體之抗原蛋白結果

Non-Denature



Denature



- 1: NS1 蛋白抗體陽性對照組
- 2: E 蛋白抗體陽性對照組
- 3: 陰性對照組
- 4-9: 進行定性之抗西尼羅病毒單株抗體

表一 以螢光免疫測定法檢測抗西尼羅病毒單株抗體與其他黃病毒家族成員之交叉反應及西方墨點檢測結果

Clone	D1	D2	D3	D4	JE	YF	WN	KUN	Mock	Western Blot
1-3C	-	-		-	-	1+	3+	3+	-	ND
5-6F	-	-		-	-	-	2+	3+	-	ND
8-11C	-	-		-	-	-	4+	4+	-	NS1.(C)
13-5C	-	-		-	-	±	2+	1+	-	ND
15-11B	-	-		-	-	-	4+	3+	-	NS1.(C)
16-3A	-	-		-	-	-	1+	±	-	ND
17-6C	-	-		-	3+	3+	4+	3+	-	NS1.(C)
21-2A						-	3+	3+	-	ND
30-10C	-	-		-	-		3+	1+	-	E.(C)
34-6H	2+	3+	2+	3+	4+	4+	4+	4+	-	E.(C)
35-3F	2+	-		-	-	-	4+	2+	-	E.(C)
36-1F	-	-		-	-	-	2+	2+	-	ND
39-2B	-	-		-	-	-	4+	3+	-	NS1.(L)
39-3B	3+	-		-	-	-	4+	1+	-	E.(L)
41-9H	-	-		-	-	-	4+	3+	-	NS1.(C)
42-6G	-	-		-	-	-	1+	1+	-	ND
45-10G	-	-		-	-		3+	3+	-	E.(C)
47-5F	-	-		-	-		4+	±	-	E.(C)
52-3H	-	-		-	-		3+	2+	-	ND
55-8F	-	-		-	-	-	3+	1+	-	E.(?)
56-6G	-	-		-	-	-	4+	1+	-	E.(C)
58-9A	-	-		-	-	±	4+	3+	-	E.(C)
59-4A	±	±	±	±	2+	±	2+	1+	-	E.(L)
64-6A	-	-		-	-	1+	3+	3+	-	E.(C)
65-8G	-	-		-	-	-	4+	4+	-	NS1.(C)
67-2B	-	-		-	-	-	3+	4+	-	ND
67-10C	-	-		-	1+	±	3+	4+	-	ND
70-8D	-	-		-	-	-	4+	3+	-	E.(C)
73-1G	-	-		-	-	1+	3+	3+	-	E.(C)
73-2B	1+	1+	±	1+	1+	3+	4+	3+	-	E.(C)
81-8C	-	-		-	-	-	3+	3+	-	ND
84-10F	-	-		-	-	2+	4+	3+	-	E.(C)
87-1F	-	-		-	-	1+	4+	3+	-	E.(C)
87-7A	-	-		-	-	1+	4+	3+	-	E.(C)
89-8F	1+	1+	±	1+	1+	1+	4+	3+	-	E.(C)
89-12G	-	-		1+	-	-	4+	4+	-	NS1.(C)
92-6H	±	±	±	±	1+	1+	4+	4+	-	E.(C)

備註：C--立體抗原決定位；L--直線抗原決定位。

表二 以螢光免疫測定法檢測抗第四型登革病毒單株抗體與其他黃病毒家族成員之交叉反應及西方墨點檢測結果

Clone	D1	D2	D3	D4	JE	YF	WN	KUN	Mock	Western Blot
2-3E	1+	1+	4+	4+	-	-	-	-	-	NS1(C)
3-5C	2+	2+	1+	3+	-	-	-	-	-	NS1(C)
4-1G	-	-	-	3+	-	-	-	-	-	NS1(C)
6-3B	-	-	-	3+	-	-	-	-	-	NS1(C)
7-6D	-	-	-	3+	-	-	-	-	-	NS1(C)
9-10E	-	-	-	3+	-	-	-	-	-	NS1(C)
10-6D	-	-	-	3+	-	-	-	-	-	NS1(C)
11-4F	-	-	-	3+	-	-	-	-	-	NS1(C)
12-2G	-	-	-	3+	-	-	-	-	-	NS1(C)
13-5H	-	-	-	3+	-	-	-	-	-	NS1(C)
15-5G	-	-	-	3+	-	-	1+	-	-	NS1(C)
16-6D	3+	2+	1+	3+	2+	4+	4+	4+	-	NS1(L)

備註：C--立體抗原決定位；L--直線抗原決定位。

表三

三年抗黃質病毒單株抗體製倍之總結果

Group No.	Isotype	Flaviviruses								Ag. Molecule		NT	
		JE	D1	D2	D3	D4	YF	WN	KUN	NS1	E		
1	G2a	4+	-	-	-	-	-	-	-	-	√		
2	G1κ	-	4+	-	-	-	-	-	-	-	√		
3	G1	2+	-	3+	-	-	-	-	-	-	monomer		
4	G1	1+	4+	2+	-	-	-	-	-	-	dimer		
5-1	G2a	1+	-	2+	-	-	-	-	-	-		√	√
5-2		3+	2+	3+	-	±	-	1+	-				
6	Mκ	-	-	-	3+	-	-	±	-			√	√
7	G1κ	-	-	-	-	4+	-	-	-	√			
8	G2ακ	-	-	-	-	-	-	3+	±			√	
9	G1	1+	-	3+	1+	-	2+	±	±	√			
10	G2ακ	1+	2+	3+	1+	3+	-	-	-	√			
11	G2a	4+	-	1+	1+	1+	-	±	-			√	√
12	G1	4+	-	1+	-	-	-	3+	-	√			
13-1	G1	4+	-	3+	-	-	-	±	-	√			
13-2		2+	-	3+	-	-	-	-	-				
14	G2a	4+	-	-	-	-	-	±	-	√			
15	G2a	4+	4+	4+	2+	4+	-	3+	2+	√			
16	G2a	4+	-	-	-	-	-	2+	2+			√	√
17	G1κ	4+	-	-	-	-	2+	3+	3+	√			
18	G2ακ	-	-	-	-	-	-	4+	3+	√			
19	G1κ	4+	-	-	-	-	2+	4+	3+	√			
20	G1	3+	-	4+	-	-	-	-	-			√	√
21	Mκ	2+	1+	2+	1+	1+	-	-	-			√	√
22-1	G1	2+	2+	2+	3+	4+	3+	3+	4+	linear			
22-2	G1λ	4+	4+	4+	2+	2+	1+	3+	2+				
23-1	G2ακ G1	3+	3+	3+	3+	3+	1+	3+	3+			√	√
23-2		2+	2+	1+	3+	4+	3+	3+	3+				
24	G3κ	-	-	-		-	-	4+	3+	linear			
25	G2ακ	-	3+	-		-	-	4+	+			linear	
26	G2ακ	2+	-	-		-	-	2+	+			linear	